



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12Q 1/40, G01N 33/84</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/50444</p> <p>(43) 国際公開日 1999年10月7日(07.10.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01209</p> <p>(22) 国際出願日 1999年3月11日(11.03.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/86074 1998年3月31日(31.03.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東洋紡績株式会社 (TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒530-8230 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 木全伸介(KIMATA, Shinsuke)[JP/JP] 川村良久(KAWAMURA, Yoshihisa)[JP/JP] 〒914-0047 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社 敦賀バイオ研究所内 Fukui, (JP) 浅野茂樹(ASANO, Shigeki)[JP/JP] 〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町17番9号 東洋紡績株式会社 東京支社内 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: REAGENT COMPOSITIONS FOR ASSAYING ELECTROLYTES</p> <p>(54) 発明の名称 電解質測定用試薬組成物</p> <p>(57) Abstract Reagent compositions for enzymatically assaying electrolytes (calcium ion, chlorine ion, etc.) which withstand as liquid reagents during distribution, have a high solution stability and are excellent in quantitative characteristics and accuracy. These compositions comprises: (a) inactivated α-amylase; (b) a chelating agent; (c) an α-amylase substrate; and (d) a cyclodextrin derivative; optionally together with an SH-group containing compound or its salt.</p>		

(57)要約

液状試薬として流通に耐えうる、高い溶液安定性を有し、さらに、定量性、正確性に優れた電解質の酵素的測定用試薬組成物を提供する。(a)不活性化型 α -アミラーゼ、(b)キレート剤、(c) α -アミラーゼ基質および(d)シクロデキストリン誘導体、または該組成物に、さらに、SH基含有化合物またはその塩を含有するカルシウムイオンまたは塩素イオンなどの電解質測定用試薬組成物である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LJ リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明 細 書

電解質測定用試薬組成物

技術分野

本発明は、体液、特に血液または尿中の電解質、例えばカルシウムイオン、塩素イオンなどの電解質を測定する試薬組成物に関し、更に詳細には α -アミラーゼ活性を利用した電解質を測定する試薬組成物に関する。

背景技術

生体内の電解質、例えばカルシウムイオン、塩素イオンなどの濃度は、通常、厳密に代謝調節されていることから、体液中の電解質の測定は、生体機能のバロメーターとして、生化学的臨床検査の中で最も一般的な分析であり、これらを測定することにより、各種疾患の診断が行われる。たとえば、血清中のカルシウムイオン量の測定は、低カルシウム血症として、低タンパク血症、低リン血症、腎炎、ネフローゼ、ビタミンD欠乏症、副甲状腺機能低下症、クル病等の疾患、高カルシウム血症としては、骨腫瘍、アジソン病、肺気腫、副甲状腺機能亢進症、腎不全等の疾患の診断に用いられる。また、血清中の塩素イオン量の測定は、低クロール血症として、低張性脱水症、グルココルチコイド過剰症、呼吸性アシドーシス等の疾患、高クロール血症としては、高張性脱水症、尿細管性アシドーシス、呼吸性アルカローシス等の疾患の診断に用いられる。

α -アミラーゼ活性を利用した電解質測定方法としては、カルシウムイオンでは、カルシウムイオンにより不活性化型 α -アミラーゼが活性化され、糖基質を分解し、分解された生成物を測定することにより、体液中のカルシウムイオンを測定するものである（特公平6-87798号公報など）。また、塩素イオンでは、同様に、塩素イオンにより、不活性化型 α -アミラーゼが活性化され、糖基質を分解し、分解された生成物を測定することにより、体液中の塩素イオンを測定するものである（特開平3-176000号公報、特開平4-94698号公報）。

これらの方法において、 α -アミラーゼは、その活性発現に必要なカルシウムイオンまたは塩素イオンをあらかじめ除去し、通常、不活性化型の状態で用いられる。また、これらの方法においては、ブランク反応をおさえる、または拮抗阻害剤として定量性を調節する、または測定対象外の類似共雑イオンをマスキングする等の目的で、測定試薬中にキレート剤を共存させている。しかし、上記不活性化型 α -アミラーゼは、キレート剤の存在下では不安定であることから、溶液状態で長期保存ができない、また、測定値が変動する等の問題を有していた。

一方、 α -アミラーゼを安定化する方法としては、従来、例えばカルシウムイオンを加える方法、塩素イオンを加える方法、アルブミンを加える方法（臨床病理 第37巻、第10号、第1155頁（1990））、アミノ酸を加える方法（特開昭51-26284号公報）、酸のアルカリ金属塩を加える方法（特開昭57-29286号公報）、メチオニンを加える方法（特開昭63-17690号公報）、アルミニウム塩を加える方法（特開平1-104173号公報）、尿素を加える方法（The Enzyme, 第3版, 第5巻, 第235~271頁（1971））、グアニジン塩酸塩を加える方法（J. Biol. Chem. 第244巻, 第48~54頁（1969））、ジチオスレイトール、メルカプトエタノールを加える方法（Biochem. Soc. Trans. 第18巻, 第310~311頁（1990））等が知られている。しかし、これらの方法では不活性化された α -アミラーゼを安定化するには不十分であり、特にキレート剤を共存させる電解質の測定においては、調製直後より顕著に α -アミラーゼが失活するため、経時的な感度低下が生じ、測定値に影響を与えることから、実用に耐えうるものではない。

一方、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリンまたは γ -シクロデキストリンが、蛋白質または糖類加水分解酵素の安定化剤として、有用であることが公知である（特開昭59-104556号公報、特開平1-117786号公報）。また、マルトース、 α -シクロデキストリン等の少糖類、またはこれらの混合物を不活性化型 α -アミラーゼの安定化剤として、使用することも公知である（特開平6-113894号公報）。しかし、この方法でも、短期間（1~2ヵ月間）の低温（2~8℃）保存には耐えうるが、長期間の保存、または実際の作業下の室温（18~37℃）での安定性がいまだ十分とはいえない。

また、マルトース等の単糖 1～3 個を結合した少糖は、 α -アミラーゼの基質生成物であることから、測定原理上、感度、定量性に影響を与えるため、使用量に制約があることから、安定化剤として用いる場合は、逆に他の性能を低下させることになるという欠点を有する。さらに、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン等は、低温での溶解性が悪く、保存中に結晶の析出、白濁等があり、長期保存には適さない等の欠点がある。

これらのことから、不活性化型 α -アミラーゼを利用した電解質測定方法では、今日、臨床検査用試薬で主流になっている液状試薬として流通に耐えうる、高い溶液安定性はいまだ達成されていないのが現状である。

本発明は、上記のような現状に鑑み、安定性、定量性、正確性に優れた電解質の酵素的測定用組成物を提供することにある。

発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討したところ、不活性化型 α -アミラーゼの安定化剤として、シクロデキストリン誘導体を使用すると、 α -アミラーゼの反応に影響がなく、低温から実使用レベルである室温での長期的な溶液安定性に優れている結果が得られことを見出し、さらに、SH 基含有化合物を併用すると、シクロデキストリン誘導体の低濃度下においても、前述の目的とする安定性が得られることを見出し、本発明に到達した。

なお、グリコシル- α -シクロデキストリンおよび/またはマルトシル- α -シクロデキストリンを p-ニトロフェニル糖基質の易溶性包接化合物として使用し、 α -アミラーゼ活性の作用により遊離するニトロフェノールを検出する α -アミラーゼ測定系が公知である（特許第 2681635 号公報）。ここでは、 α -アミラーゼは活性化型 α -アミラーゼであり、また、キレート化合物が存在していない。したがって、本発明の不活性化型 α -アミラーゼのキレート化合物の存在下における液状試薬としての安定性などを示唆するものではない。

すなわち、本発明は (a) 不活性化型 α -アミラーゼ、(b) キレート剤、(c) α -アミラーゼ基質および (d) シクロデキストリン誘導体を含有することを特徴とする電解質測定用試薬組成物である。

また、本発明は (a) 不活性化型 α -アミラーゼ、(b) キレート剤、(c) α -アミラーゼ基質および (d) シクロデキストリン誘導体、さらに、(e) SH 基含有化合物またはその塩を含有する電解質測定用試薬組成物である。

本発明の電解質測定用試薬組成物は、 α -アミラーゼの活性化剤であるカルシウムまたは塩素等のイオンにより、不活性化型 α -アミラーゼが活性化されることを利用し、活性型 α -アミラーゼの作用により分解された生成物を測定することにより、試料中の電解質を測定するものであり、次のような測定原理に従う。

(1) マルトオリゴ糖を基質とする方法：基質として、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオースなどを用い、活性化された α -アミラーゼ、さらには α -グルコシダーゼ等の追随酵素の作用により、これらの基質からグルコースを遊離させ、グルコースの量を測定することで、カルシウム等の電解質量を知る。

生成したグルコースの測定方法としては、グルコースオキシダーゼーペルオキシダーゼ法、ヘキソキナーゼーグルコースー6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ法などがある。

グルコースオキシダーゼーペルオキシダーゼ法では、遊離したグルコースにグルコースオキシダーゼを作用させ、生成した過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下、フェノール等の酸化発色物質とカプラーを酸化縮合し、キノン色素に導き、その吸光度をレート測定する方法である。

ヘキソキナーゼーグルコースー6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ法では、ヘキソキナーゼにより遊離したグルコースからグルコースー6-リン酸に導き、続いて、グルコースー6-リン酸に NAD^+ 、または NADP^+ の存在下、グルコースー6-ホスフェートデヒドロゲナーゼを作用させ、 NADH または NADPH の増加反応をレート測定する方法である。

(2) マルトオリゴ糖の還元末端にフェニル基、ナフチル基、またはそれらの誘導体をアグリコンとして結合させた誘導体を基質とする方法：p-ニトロフェニルマルトペンタオシド、p-ニトロフェニルマルトヘキサオシド、p-ニトロフェニルマルトヘプタオシド、2, 4-ジクロロニトロフェニルマルトペンタオシド、2-クロロ-4-ニトロフェニルマルトトリオシド、2-クロロ-4-ニト

ロフェニルマルトペンタオシド等を基質として用い、活性化された α -アミラーゼを作用させ、必要により、 α -グルコシダーゼ等の追随酵素を作用させて、これらの基質からアグリコンを遊離させ、遊離したアグリコンの量を光学的に測定することにより、カルシウム等の電解質量を知る。

(3) マルトオリゴ糖の還元末端にフェニル基、ナフチル基、またはそれらの誘導体をアグリコンとして結合させたマルトオリゴ糖誘導体の非還元末端のグルコースの4位および6位のヒドロキシル基が何らかの手段で修飾された誘導体を基質とする方法：該方法としては、上記(2)に準ずるが、基質として、非還元末端グルコースがハロゲン、グルコピラノシル基等で修飾されたタイプの基質（例えば、特開昭60-237998号公報）あるいは、4位および6位のヒドロキシル基をアルキル基、アルコイル基またはフェニル基で置換したタイプの基質（例えば、特開昭60-54395号公報、特開平1-157996号公報）あるいは4位および6位のヒドロキシル基を β -ガラクトピラノシル基で置換したタイプの基質（例えば、特開平3-264596号公報、特開平6-315399号公報）などを用いる方法がある。

これら公知の測定法の中でも、上記(3)に示す測定法は、原理的に優れ、その中でも、2-クロロ-4-ニトロフェニル-4-O- β -D-ガラクトピラノシル- α -マルトシドを用いる方法は、非還元末端が修飾されていることから、内因性 α -グルコシダーゼ等による分解による試薬ブランクの上昇がなく、また、追随酵素を必要としないことから、低コストであり、さらに、 α -アミラーゼの基質親和性が高いため、好感度であるといったメリットがあり、本発明の電解質測定方法として特に好ましい。

本発明の一実施様態として、カルシウムイオンの測定について示すと、試料中のカルシウムイオンに不活性化型 α -アミラーゼ、キレート剤、 α -アミラーゼ基質、シクロデキストリン誘導体、または、さらにSH基含有化合物を含有する電解質測定用試薬組成物を作用させる。さらに、 α -アミラーゼ基質として、例えば2-クロロ-4-ニトロフェニル-4-O- β -D-ガラクトピラノシル- α -マルトシドを作用させ、遊離する2-クロロ-4-ニトロフェノールを測定し、試料中のカルシウム量を知るものである。

本発明のシクロデキストリン誘導体は、いわゆる分岐シクロデキストリン誘導体であり、このような誘導体としては、グリコシル- α -シクロデキストリン、マルトシル- α -シクロデキストリン、グリコシル- β -シクロデキストリン、マルトシル- β -シクロデキストリン、グリコシル- γ -シクロデキストリン、マルトシル- γ -シクロデキストリン、メチル- β -シクロデキストリン、カルボキシメチル- β -シクロデキストリン、トリアセチル- β -シクロデキストリン、ヒドロキシエチル- β -シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン等がある。該化合物は、通常、水溶性向上のために側鎖を導入したものである。また、これら側鎖は、溶解性を向上させる目的で、シクロデキストリンの環状骨格にいくつ導入されても良く、また、これら誘導体を複数組み合わせ用いても良い。

該シクロデキストリン誘導体の試薬組成中の濃度は、0.01~100mMの範囲で用いられる。該シクロデキストリン誘導体中に含まれる不純物等による α -アミラーゼ反応への影響およびニトロフェノール等の発色源基がシクロデキストリンに包接されることによる感度への影響等を考慮し、好ましくは、1~12mMである。

本発明のSH基含有化合物とは、通常、タンパク質等のSH基に対し、保護または抗酸化作用を有する、またはジスルフィド結合を還元し切断する作用を有するSH基を含有する化合物を指し、例えば、N-アセチルシステイン、ジチオスレイトール、グルタチオン、チオグリセロール、メルカプトエタノール、チオサリチル酸、チオ尿素等があげられるが、特に、N-アセチルシステイン、還元型グルタチオンなどが好適である。該SH基含有化合物の試薬組成中濃度は、0.01~50mMの範囲で用いられるが、溶解性等を考慮し、0.01~20mMが好適である。また、これらのSH基含有化合物は複数組み合わせ用いても良い。

本発明の α -アミラーゼとは、微生物、植物、または動物のいずれの起源のものも用いることができるが、好適には動物起源のものであり、例えばブタ膵由来の α -アミラーゼが例示される。しかしながら、本発明に用いられる α -アミラーゼは脱塩されて、不活性化型である必要がある。不活性化型 α -アミラーゼは、

前述のように試料中のカルシウムまたは塩素等の電解質を得て、活性化型 α -アミラーゼとなり、 α -アミラーゼの基質と反応する。脱塩方法としては、透析、限外濾過、イオン交換、カラム除去などの方法がある。不活性化型 α -アミラーゼの試薬組成中の濃度は、好ましくは0.5~1000 IU/mlの範囲で用いられる。

本発明のキレート剤とは、エチレンジアミン四酢酸、およびその塩、グリコールエーテルジアミン四酢酸、1,2-ビス(o-アミノフェノキシ)エタン四酢酸、トランス-1,2-ジアミノシクロヘキサン四酢酸等があげられる。キレート剤の電解質測定組成中での役割としては、前述のようにブランク反応をおさえる、または拮抗阻害剤として定量性を調節する、または測定対象外の類似共雑イオンをマスキングする等があげられるが、逆に α -アミラーゼの失活を招く要因の一つでもあることから、該キレート剤の試薬組成中での濃度は、これらを勘案した上で設定すべきであるが、0.01~10 mMで好適に用いられる。また、これらのキレート剤は複数組み合わせ用いても良い。

本発明に係る α -アミラーゼの基質は、前述のとおり何ら限定されるものではないが、追随酵素を必要としないことから低コストであるというメリットより、2-クロロ-4-ニトロフェニルマルトリオシド、2-クロロ-4-ニトロフェニル4-O- β -D-ガラクトピラノシルマルトシドが好適である。さらに、非還元末端が修飾されていることから、内因性 α -グルコシダーゼ等による分解による試薬ブランクの上昇がない、 α -アミラーゼの基質親和性がより高いため好感度であるといったメリットがあることから、2-クロロ-4-ニトロフェニル4-O- β -D-ガラクトピラノシルマルトシドが好適に用いられる。該基質の試薬組成中での濃度は、0.1~50 mMで好適に用いられる。

また、本発明の試薬組成物には、試薬ブランクをおさえる、定量性を向上させる等の目的のため、必要により、最終的な光学的測定法が異なる2種の基質を組み合わせ用いることで、糖分解反応を競合させ、見かけの基質親和性を低下させることができる。例えば、マルトオリゴ糖、またはその還元末端グルコースに非発色源基が結合したマルトオリゴ糖より選ばれる基質を競合させ、主反応である、還元末端グルコースに発色源基を結合させるか、または、さらに非還元末端

に置換基を結合させた基質に対する α -アミラーゼの反応速度を調節する。

ここで用いられるマルトオリゴ糖としては、例えば、マルトース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどのグルコース数が2～7のマルトオリゴ糖が挙げられ、還元末端グルコースに非発色源基が結合したマルトオリゴ糖としては、例えば、2, 4-ジクロロフェニル- α -D-マルトリオシド、2, 4-ジクロロフェニル- (α または β)-D-マルトペンタオシド、2, 4-ジクロロフェニル- (α または β)-D-マルトリオシドなどが挙げられる。これらのマルトオリゴ糖の濃度としては、試薬組成中で50～250 mMで好適に用いられる。

本発明での試薬組成物の最終pHは5.0～8.0の範囲であり、より一層、 α -アミラーゼの糖分解反応速度そのものを制御し、測定範囲を広げることが可能となる。一方、 α -アミラーゼの安定至適pHは6～8の中性付近であることより、本発明の試薬組成物をpH6～8の範囲で調製するのが好ましいと考えられるが、同時に定量性等の性能を得るには、最終pHを調製する試薬をさらに処方し、第一試薬と第二試薬に分け、これらが混合した状態で反応至適pHになるように処方することもできる。試薬pHを保持する方法は公知の方法であれば、何ら限定されるものではないが、一般的には緩衝剤が用いられる。用いる緩衝剤としては、例えば、グッド緩衝剤、トリス緩衝剤、リン酸緩衝剤等が挙げられる。緩衝剤は10～500 mMの濃度で好適に用いられる。

本発明の目的とする試薬安定性を維持した状態で、定量性を得る方法として、前述した(1)キレート剤の添加、(2)マルトオリゴ糖の添加、(3)試薬pHの調節などがあるが、単独あるいは組み合わせて用いることができる。

さらに、本発明の試薬組成物には、必要に応じて、イオノフォア、クラウンエーテル等の干渉電解質の影響回避、または感度調節のため、干渉電解質または、測定対象電解質に対する選択的結合剤を使用することができる。選択的結合剤としては、前述のキレート剤の他に、18-クラウン-6 (メルク社製)、クリプトフィックス221 (メルク社製)などがあげられる。また、必要に応じて、防腐剤、界面活性剤、酸化防止剤、プロテアーゼ阻害剤等を測定する電解質の定量性に影響を及ぼさない範囲で使用することもできる。

防腐剤としては、特に限定されないが、 α -アミラーゼの安定性に対する影響の少ない、アジ化ナトリウム、または、セフェム系、ペニシリン系、アミノグリコシド系、キノロン系等の抗生物質、等が好適に用いられ、これらを単独あるいは組み合わせて使用することができる。界面活性剤としては、非イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤などを単独あるいは組み合わせて使用することができる。

また測定する電解質がカルシウムイオンの場合は、アルカリ金属のハロゲン化物、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウムなどを3～300mMの濃度で添加することが好ましい。また測定する電解質が塩素イオンの場合は2価カチオン、例えば、カルシウム、マグネシウム、バリウム、亜鉛等を0.01～200mMの濃度で添加することができる。

酸化防止剤としては、アスコルビン酸およびその塩、ソルボース等の糖類、カタラーゼ等があげられる。プロテアーゼ阻害剤としてはPMSF等が挙げられる。

本発明では、不活性化型 α -アミラーゼが、前述のように試料中のカルシウムまたは塩素等の電解質を得て、活性化型 α -アミラーゼとなり、 α -アミラーゼの基質と反応することを利用する。前述の自体公知である測定方法に基づく操作法に従い、測定することができる。例えば、カルシウムの測定の場合は、試料中のカルシウムイオンに不活性化型 α -アミラーゼ、キレート剤、シクロデキストリン誘導体または、さらにSH基含有化合物を含有する電解質測定用試薬組成物を作用させ、さらに α -アミラーゼの基質として、2-クロロ-4-ニトロフェニル-4-O- β -D-ガラクトピラノシル- α -マルトシドを作用させることで、カルシウム量に依存して活性化された α -アミラーゼの反応により、2-クロロ-4-ニトロフェノールを生成する。2-クロロ-4-ニトロフェノールが、それ自体400nm付近に吸収があることから、遊離後、400nm付近の吸光度の変化を測定し、既知濃度の試料の吸光度を対照に、試料中のカルシウムの濃度を求める。2-クロロ-4-ニトロフェノールの測定方法としては、アミラーゼの反応を連続的に追跡するレート法および一定時間反応させた後反応を止めて測定するエンドポイント法のいずれもが使用されうる。

本発明の別な実施様態として、塩素イオンの測定について示すと、試料中の塩

素イオンに不活性化型 α -アミラーゼ、キレート剤、 α -アミラーゼ基質、シクロデキストリン誘導体または、さらにSH基含有化合物を含有する電解質測定用試薬組成物を作用させる。さらに、 α -アミラーゼ基質として、2-クロロ-4-ニトロフェニル-4-O- β -D-ガラクトピラノシル- α -マルトシドを作用させ、遊離する2-クロロ-4-ニトロフェノールを測定し、試料中の塩素イオン量を知るものである。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものでない。

実施例1

下記試薬組成からなるカルシウム測定用試薬のうち、シクロデキストリン誘導体として、グリコシル- α -シクロデキストリン (G1 α CD)、マルトシル- α -シクロデキストリン (G2 α CD)、グリコシル- β -シクロデキストリン (G1 β CD)、マルトシル- β -シクロデキストリン (G2 β CD) を各々単独で、0、1.5、3、6、12mMの濃度になるように添加して、酵素試薬を調製した。また、グリコシル- β -シクロデキストリン3mMである酵素試液には、さらにN-アセチルシステインまたは還元型グルタチオンを各々単独で2.5、5、10、20mMの濃度になるように添加した。

A. 試薬組成

(1) 酵素試液

トリス塩酸バッファー (pH 7.3)	50 mM
不活性化型 α -アミラーゼ (ブタ膵臓由来)	1.7 IU/ml
NaCl	200 mM
1,2-ビス(o-アミノフェノキシ)エタン四酢酸	0.8 mM
マルトース	160 mM
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル	0.05 %
シクロデキストリン誘導体	表1記載
SH基含有化合物	表1記載

(2) 基質試液

グッド緩衝液 (pH 5.7)	300 mM
NaCl	200 mM
マルトース	160 mM
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル	0.05 %
2-クロロ-4-ニトロフェニル-4-O- β -D-ガラクトピラノシル- α -マルトシド	0.8 mM

上記方法により調製した両試液を4℃で3ヵ月間保存し、調製直後および保存後の試液の目視観察を行い、結晶の析出または白濁の有無について確認を行った。調製直後の目視観察結果を表1、保存後の目視観察結果を表2に示す。

比較例1

上記した試薬組成のシクロデキストリン誘導体およびSH基含有化合物に代えて、 α -シクロデキストリン (α CD) (1.5、3、6、12mM)、 β -シクロデキストリン (β CD) (1.5、3、6、12mM)、 γ -シクロデキストリン (γ CD) (1.5、3、6、12mM) を各々単独で、表1に記載の濃度になるように添加し、実施例1と同様に調製した両試液を4℃で3ヵ月間保存し、調製直後および保存後の試液の目視観察を行い、結晶の析出または白濁の有無について確認を行った。調製直後の目視観察結果を表1、保存後の目視観察結果を表2に示す。

表 1

+ : 濁りあり - : 濁りなし

実 施 例	添加剤（濃度mM）	0	1.5	3	6	12
	無添加	—	—	—	—	—
	G1αCD	—	—	—	—	—
	G1βCD	—	—	—	—	—
	G2αCD	—	—	—	—	—
	G2βCD	—	—	—	—	—
	添加剤（濃度mM）	0	2.5	5	10	20
	3mM G1βCD + NAC	—	—	—	—	—
	3mM G1βCD + GSH	—	—	—	—	—
比 較 例	添加剤（濃度mM）	1.5	3	6	12	
	αCD	—	—	+	+	
	βCD	—	—	+	+	
	γCD	—	—	+	+	

G 1 : グリコシル

NAC : N-アセチルシステイン

G 2 : マルトシル

GSH : 還元型グルタチオン

CD : シクロデキストリン

表 2

実 施 例	添加剤（濃度mM）	0	1.5	3	6	12
	無添加	—	—	—	—	—
	G1αCD	—	—	—	—	—
	G1βCD	—	—	—	—	—
	G2αCD	—	—	—	—	—
	添加剤（濃度mM）	0	2.5	5	10	20
	3mM G1βCD + NAC	—	—	—	—	—
	3mM G1βCD + GSH	—	—	—	—	—
比 較 例	添加剤（濃度mM）	1.5	3	6	12	
	αCD	—	+	+	+	
	βCD	—	+	+	+	
	γCD	—	+	+	+	

表1および表2から明らかなように、比較例1の α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリンでは、調製直後で6 mMの場合、すでに濁りが生じ、4℃、3ヶ月保存後には3 mMの場合、濁りが生じている。しかし、実施例1のシクロデキストリン誘導体を用いた場合は、実施条件の最高濃度である12 mMでも濁りがなく、清澄であることがわかる。

実施例2

上記実施例1に示す試薬組成からなるカルシウム測定試薬の酵素試液において、シクロデキストリン誘導体として、グリコシル- α -シクロデキストリン、マルトシル- α -シクロデキストリン、グリコシル- β -シクロデキストリン、マルトシル- β -シクロデキストリン、を各々単独で12 mMで添加した。

また、グリコシル- β -シクロデキストリン3 mMである酵素試液に、さらに、N-アセチルシステインまたは還元型グルタチオンを各々単独で、20 mMになるように添加し、35℃で7日間保存した。そして、調製直後、および35℃で7日間保存した酵素試液中の α -アミラーゼの活性を市販の α -アミラーゼ活性測定試薬（ダイヤカラー・リキッドAMY；東洋紡績（株）製）で測定し、35℃、7日保存後の残存活性（%）を求めた。その結果を表3および図1に示す。

比較例2

上記実施例1に示す試薬組成のシクロデキストリン誘導体およびSH基含有化合物に代えて、グルコース（100 mM）、マルトース（50 mM）、マルトリオース（30 mM）、 α -シクロデキストリン（1.5 mM）、 β -シクロデキストリン（1.5 mM）、 γ -シクロデキストリン（1.5 mM）、N-アセチルシステイン（20 mM）、還元型グルタチオン（20 mM）を各々単独で表3に記載の濃度になるように添加した。調製した試液は実施例2と同様に4℃で3ヵ月間、35℃で7日間保存し、酵素試液中の α -アミラーゼの活性を測定し、35℃、7日保存後の残存活性（%）を求めた。その結果を表3および図1に示す。

表 3

No	添加剤	残存活性 (%)
1	無添加	67.6
2	G1 α CD (12mM)	80.4
3	G1 β CD (12mM)	91.7
4	G2 α CD (12mM)	82.3
5	G2 β CD (12mM)	93.0
6	3mM G1 β CD + NAC (20mM)	94.5
7	3mM G1 β CD + GSH (20mM)	95.8
8	グルコース (100mM)	67.4
9	マルトース (50mM)	73.5
10	マルトリオース (30mM)	77.3
11	α CD (1.5mM)	70.5
12	β CD (1.5mM)	77.4
13	γ CD (1.5mM)	74.6
14	NAC (20mM)	71.2
15	GSH (20mM)	75.4

表3および図1から明らかなように、無添加時および比較例2に比べ、実施例2であるシクロデキストリン誘導体、または、さらにSH基含有化合物の添加で α -アミラーゼの安定性が向上していることがわかる。

実施例 3

上記実施例 1 に示す試薬組成からなるカルシウム測定試薬の酵素試液において、シクロデキストリン誘導体として、グリコシル- α -シクロデキストリン、マルトシル- α -シクロデキストリン、グリコシル- β -シクロデキストリン、マルトシル- β -シクロデキストリンを各々単独で 0、1、5、3、6、12 mM で添加した。また、グリコシル- β -シクロデキストリン 3 mM である酵素試液に、さらに、N-アセチルシステインまたは還元型グルタチオンを各々単独で、2、5、5、10、20 mM で調製し、次のようにしてカルシウム標準液のカルシウムイオン測定を実施した。

10 mg/dl カルシウム標準液を試料とし、調製直後の試液を用いて、下記カルシウム量の測定方法に従い、測定を実施し、シクロデキストリン誘導体無添加時の感度を 100% とした各試薬条件での相対感度 (%) を求めた。その結果を表 4 に示す。

B. カルシウム量の測定方法

試料 5、8 μ l に酵素試液 180 μ l 加え、5 分間予備加温した後、さらに、基質試液 90 μ l を加えて反応を開始させ、該基質試液添加後、2 分後から 3 分間における 1 分あたりの吸光度変化を求め、精製水およびカルシウム 10 mg/dl 標準液での 2 点検量線に基づき、試料中のカルシウム量を求めた。

なお、測定装置は日立 7170 形自動分析装置を使用し、測定波長は、主波長 405 nm、副波長 546 nm であり、温度 37℃ で測定を実施した。

比較例 3

上記実施例 1 に示す試薬組成のシクロデキストリン誘導体および SH 基含有化合物に代えて、マルトース (6、3、12、5、25、50 mM)、マルトトリオース (3、8、7、5、15、30 mM) を各々単独で、表 4 に記載の濃度で添加した。調製した試液は、実施例 3 と同様にカルシウム標準液の測定を実施した。その結果を表 4 に示す。

表 4

無添加を100%としたときの相対感度(%)

実 施 例	添加剤 (濃度mM)	0	1.5	3	6	12
	無添加	100.0				
	G1 α CD		112.8	120.2	122.3	118.9
	G1 β CD		120.7	128.6	133.2	122.5
	G2 α CD		112.5	123.0	119.4	122.8
	添加剤 (濃度mM)	0	2.5	5	10	20
	3mM G1 β CD + NAC	124.3	123.0	123.8	123.3	123.5
	3mM G1 β CD + GSH		123.5	123.0	123.3	123.3
比 較 例	添加剤 (濃度mM)	6.3	12.5	25	50	
	マルトース	99.7	89.3	83.9	70.1	
	添加剤 (濃度mM)	3.8	7.5	15	30	
	マルトリオース	47.1	24.3	7.4	4.6	

表4から明らかなように、比較例3であるマルトースまたはマルトリオースの添加では、著しく標準液感度が下がるが、実施例3であるシクロデキストリン誘導体の添加では、感度はむしろ向上し、1.5mM以上ではほぼ感度に変動がなく、さらにSH基含有化合物の添加でも感度に変動がないことがわかる。

実施例4

上記実施例1に示す試薬組成のカルシウム測定試薬の酵素試液において、シクロデキストリン誘導体として、グリコシル- β -シクロデキストリンを12mMで添加した。また、グリコシル- β -シクロデキストリン3mMである酵素試液に、さらに、還元型グルタチオンを20mMで添加し、35℃で7日間保存した。カルシウム直線性の測定は、50mg/dlカルシウム水溶液を10水準に希釈したものを試料とし、調製直後、および3-5℃、7日間保存後の試液を用いて、実施例3、B. カルシウム量の測定方法に従い実施した。その結果を図3および4に示す。

比較例 4

上記実施例 1 に示す試薬組成のシクロデキストリン誘導体および SH 基含有化合物に代えて、 β -シクロデキストリンを 1.5 mM で添加した。調製した試液は実施例 3 と同様に、35℃で 7 日間保存し、カルシウム直線性の測定を実施した。その結果を図 2 に示す。

図 2 から明らかなように、比較例 4 である、 β -シクロデキストリン添加時の 35℃、7 日間保存後の直線性がそりがり、高値での定量性が低下しているのに対し、図 3 および図 4 の実施例 4 であるグリコシル- β -シクロデキストリン、およびグリコシル- β -シクロデキストリンに加え、還元型グルタチオンを添加すると、35℃、7 日間保存後においても高値での定量性を維持していることがわかる。

本発明の電解質測定用試薬組成物は、不活性化型 α -アミラーゼの安定化剤としてシクロデキストリン誘導体、または、さらに SH 基含有化合物を添加することにより、 α -アミラーゼの酵素反応に影響を与えることなく、 α -アミラーゼの安定化効果を得ることができ、低温から実際の使用レベルである室温での長期的な溶液安定性に優れる。該組成物は安定性、定量性、正確性に優れた電解質の酵素的測定用組成物である。

図面の簡単な説明

図 1：実施例 2 および比較例 2 において、35℃、7 日間保存後の α -アミラーゼの残存活性を示す図である。縦軸に α -アミラーゼの残存活性 (%)、横軸に対応する組成 No を示す。

図 2：比較例 4 において、 β -シクロデキストリン 1.5 mM を添加した場合の調製直後、および 35℃、7 日間保存後のカルシウム直線性を示す図である。

図 3：実施例 4 において、グリコシル- β -シクロデキストリン 12 mM を調製した場合の調製直後、および 35℃、7 日間保存後のカルシウム直線性を示す図である。

図 4：実施例 4 において、グリコシル- β -シクロデキストリン 12 mM に加えて、還元型グルタチオン 20 mM を添加した場合の調製直後、および 35℃、7

日間保存後のカルシウム直線性を示す図である。

請 求 の 範 囲

1. (a) 不活性化型 α -アミラーゼ、(b) キレート剤、(c) α -アミラーゼ基質および(d) シクロデキストリン誘導体を含有することを特徴とする電解質測定用試薬組成物。
2. シクロデキストリン誘導体が、グリコシル- α -シクロデキストリン、マルトシル- α -シクロデキストリン、グリコシル- β -シクロデキストリン、マルトシル- β -シクロデキストリン、グリコシル- γ -シクロデキストリン、マルトシル- γ -シクロデキストリン、メチル- β -シクロデキストリン、カルボキシメチル- β -シクロデキストリン、トリアセチル- β -シクロデキストリン、ヒドロキシエチル- β -シクロデキストリンおよびヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンからなる群から選択された分岐シクロデキストリン誘導体である請求項1記載の電解質測定用試薬組成物。
3. シクロデキストリン誘導体が、グリコシル- β -シクロデキストリンまたはマルトシル- β -シクロデキストリンである請求項1記載の電解質測定用試薬組成物。
4. さらに、(e) SH基含有化合物またはその塩を含有する請求項1～3のいずれかに記載の電解質測定用試薬組成物。
5. SH基含有化合物が、N-アセチルシステインまたは還元型グルタチオンである請求項4記載の電解質測定用試薬組成物。
6. 電解質がカルシウムイオンである請求項1～5のいずれかに記載の電解質測定用試薬組成物。

7. 電解質が塩素イオンである請求項1～5のいずれかに記載の電解質測定用試薬組成物。

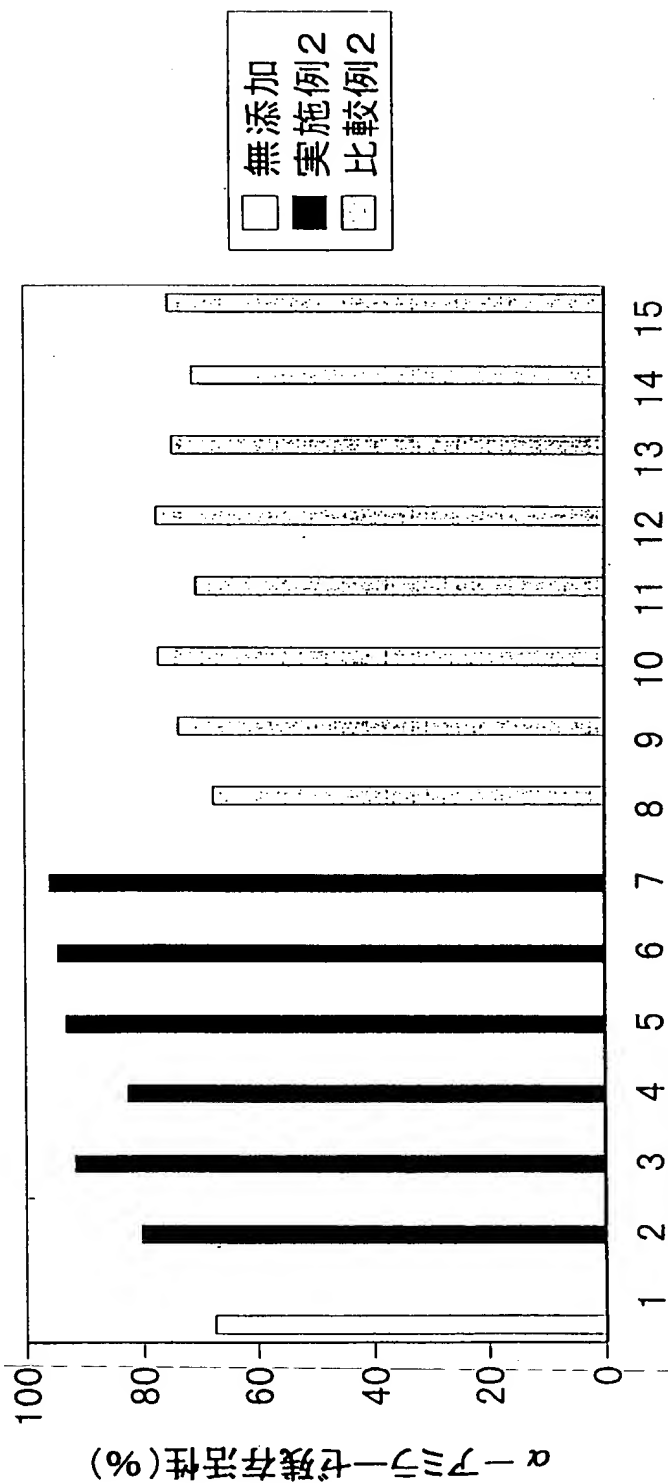
8. (a) 不活性化型 α -アミラーゼ、(b) キレート剤、(c) α -アミラーゼ基質および(d) グリコシル- β -シクロデキストリンまたはマルトシル- β -シクロデキストリンを含有することを特徴とするカルシウムイオン測定用試薬組成物。

9. (a) 不活性化型 α -アミラーゼ、(b) キレート剤、(c) α -アミラーゼ基質および(d) グリコシル- β -シクロデキストリンまたはマルトシル- β -シクロデキストリンを含有することを特徴とする塩素イオン測定用試薬組成物。

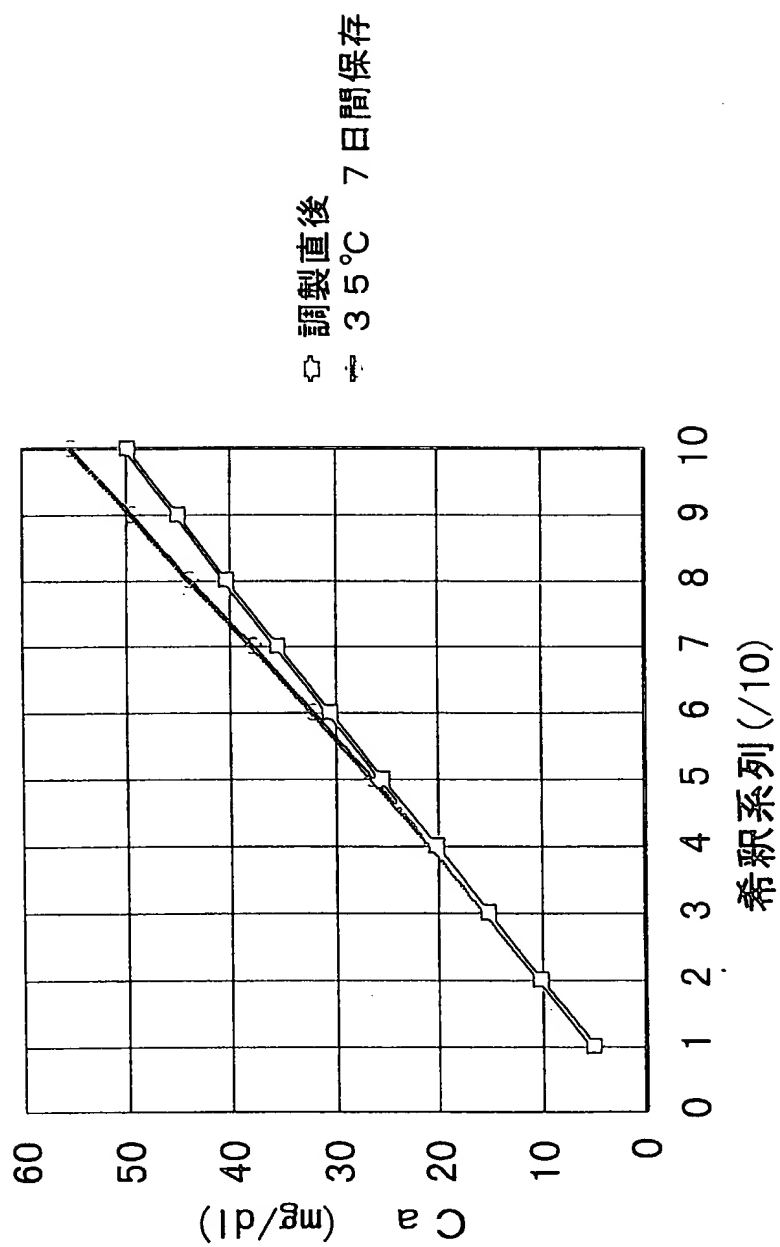
10. (a) 不活性化型 α -アミラーゼ、(b) キレート剤、(c) α -アミラーゼ基質、(d) グリコシル- β -シクロデキストリンまたはマルトシル- β -シクロデキストリンおよび(e) N-アセチルシステインまたは還元型グルタチオンを含有することを特徴とするカルシウムイオン測定用試薬組成物。

11. (a) 不活性化型 α -アミラーゼ、(b) キレート剤、(c) α -アミラーゼ基質、(d) グリコシル- β -シクロデキストリンまたはマルトシル- β -シクロデキストリンおよび(e) N-アセチルシステインまたは還元型グルタチオンを含有することを特徴とする塩素イオン測定用試薬組成物。

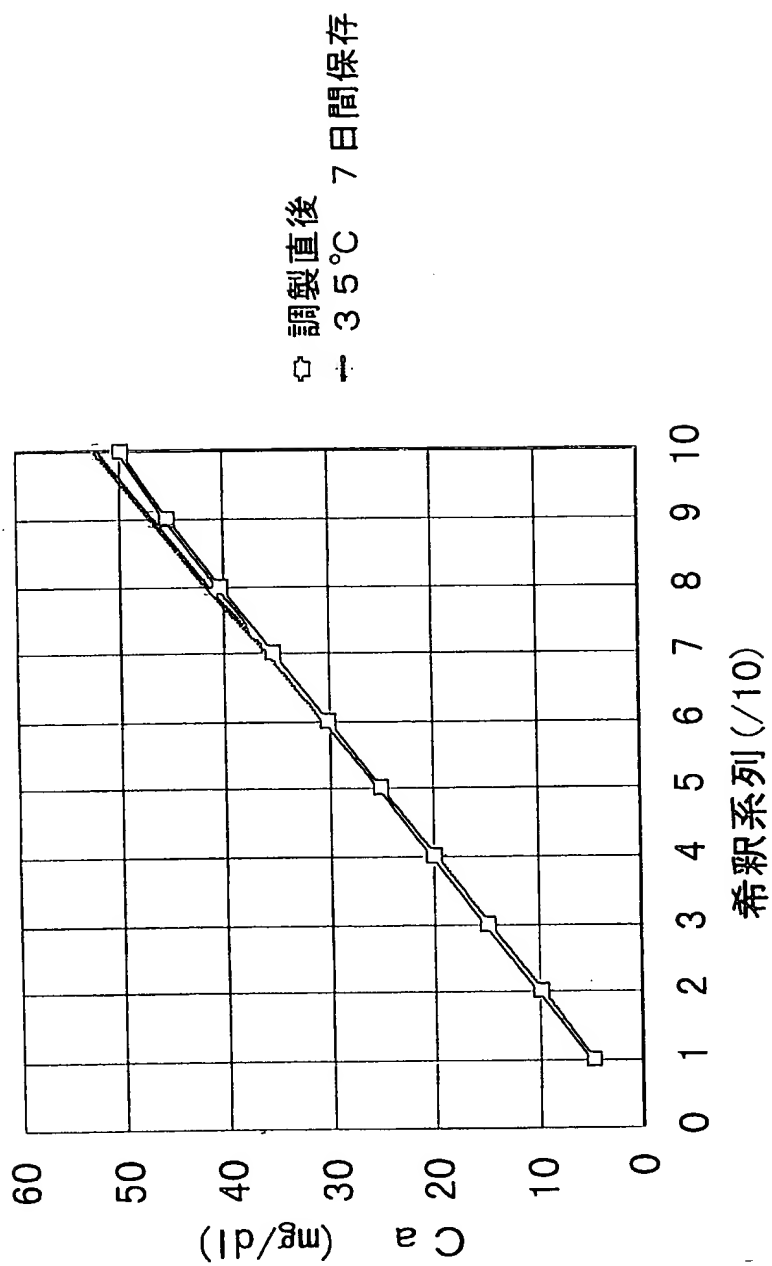
【図1】



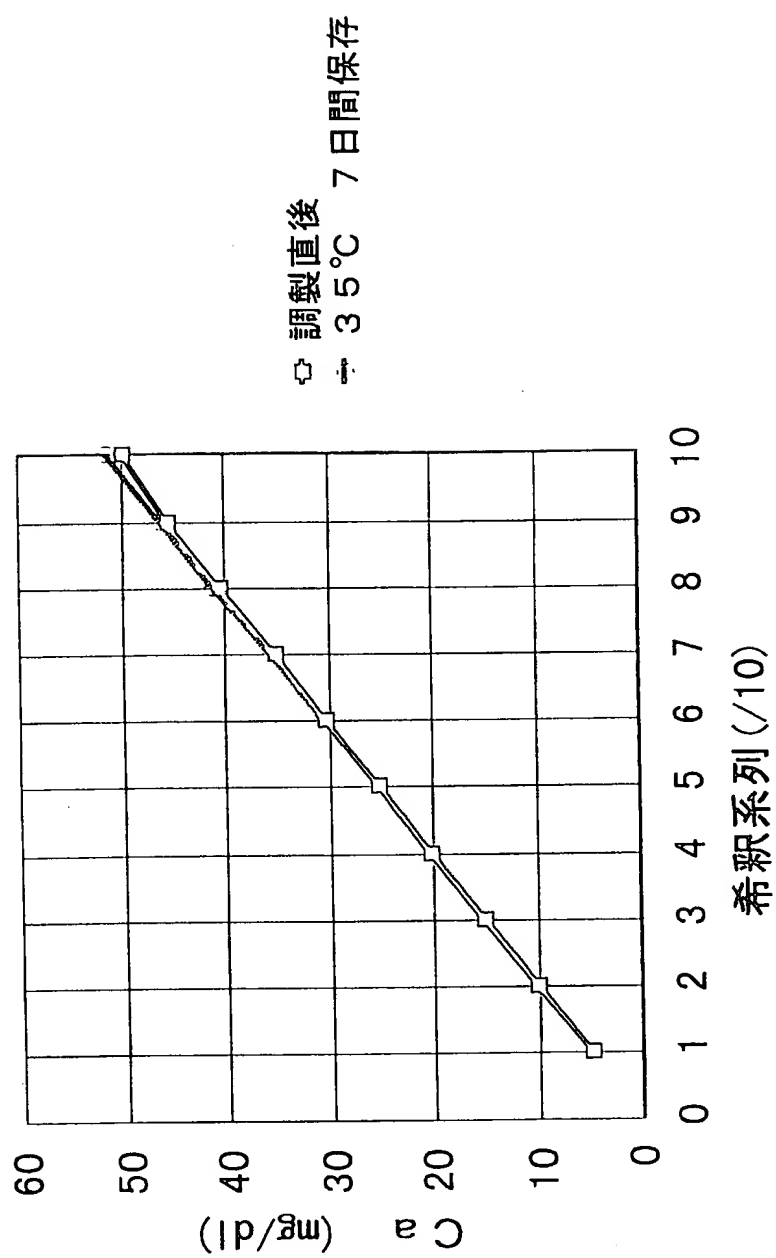
【図2】



【図3】



【図4】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12Q1/40, G01N33/84

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12Q1/40, G01N33/84

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-113894, A (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), 26 April, 1994 (26. 04. 94) (Family: none)	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
7 June, 1999 (07. 06. 99)Date of mailing of the international search report
15 June, 1999 (15. 06. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/01209

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C 1 2 Q 1 / 4 0, G 0 1 N 3 3 / 8 4

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C 1 2 Q 1 / 4 0, G 0 1 N 3 3 / 8 4

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 6-113894, A (小野薬品工業株) 26.4月.1994 (26.04.94) (ファミリーなし)	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 07.06.99

国際調査報告の発送日 15.06.99

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 滝本 晶子

4 B 9 4 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448